

Заключение диссертационного совета

99.0.064.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» Дальневосточного отделения Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 20 декабря 2022 г., №12

О присуждении Супруну Андрею Романовичу, российское гражданство, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Регуляция экспрессии генов *Arabidopsis thaliana* L. с помощью экзогенного применения *in vitro* синтезированных РНК» по специальностям 1.5.6 – Биотехнология и 1.5.4. – Биохимия (биологические науки) принята к защите 18 октября 2022 г., протокол №11 диссертационным советом 99.0.064.02, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, 690022, г. Владивосток, пр. 100-тия Владивостока, 159, №1108/нк от 16.11.2017 г.

Соискатель Супрун Андрей Романович, 13 августа 1996 года рождения. В 2020 году окончил с отличием Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», с 2020 г. по настоящее время является очным аспирантом Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет». Работал с 2020 г. в должности ведущего инженера, а с 2021 г. по настоящее время является младшим научным сотрудником лаборатории биотехнологии ФГБУН «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН.

Диссертация выполнена на кафедре биохимии и биотехнологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Дальневосточный федеральный университет» и в лаборатории биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук, профессор Костецкий Эдуард Яковлевич, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Дальневосточный федеральный университет», заведующий кафедрой биохимии и биотехнологии. Научный консультант - кандидат биологических наук Дубровина Александра Сергеевна, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии» ДВО РАН, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии.

Официальные оппоненты:

Соловьев Андрей Геннадьевич, доктор биологических наук, профессор, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», зав. отделом биохимии вирусов растений;

Мельникова Дарья Игоревна, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» ДВО РАН, научный сотрудник лаборатории фармакологии дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва в своем положительном отзыве, подписанном к.б.н., старшим научным сотрудником лаб. маркерной и геномной селекции растений Кировым Ильей Владимировичем, указала, что «диссертационная работа представляет собой самостоятельную научно-квалификационную работу, которая выполнена на высоком научно-

теоретическом и методическом уровне. Экспериментальные данные и методические подходы диссертации могут быть рекомендованы для применения в практической работе – как основа для создания новых технологий для регуляции ценных свойств растений. Данные результаты имеют ценность для обогащения дисциплин «Генетика», «Биохимия». По актуальности темы, научному уровню, теоретической и практической значимости результатов диссертационная работа отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а её автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 1.5.6 – Биотехнология (биологические науки)» и 1.5.4 – Биохимия (биологические науки)».

Соискатель имеет 29 опубликованных работ, из них 7 по теме диссертации, в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК опубликовано 6 статей, общим объемом 89 стр., 1 работа опубликована в международной конференции, общим объемом 1 стр.

Наиболее значительные работы:

1. Kiselev K.V., Suprun A.R., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Dubrovina A.S. Physiological Conditions and dsRNA Application Approaches for Exogenously induced RNA Interference in *Arabidopsis thaliana* // *Plants*. – 2020 – V. 10. – P. 264.

2. Kiselev K.V., Suprun A.R., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Kalachev A.V., Dubrovina A.S. External dsRNA downregulates anthocyanin biosynthesis-related genes and affects anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana* // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021 – V. 22. – P. 6749.

3. Kiselev K.V., Suprun A.R., Aleynova O.A., Ogneva Z.V., Kostetsky E.Y., Dubrovina A.S. The Specificity of Transgene Suppression in Plants by Exogenous dsRNA // *Plants-Basel*. – 2022 – V. 11. – P. 715.

4. Nityagovsky N.N., Kiselev K.V., Suprun A.R., Dubrovina A.S. Exogenous dsRNA Induces RNA Interference of a Chalcone Synthase Gene in *Arabidopsis thaliana* // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022 – V. 23. – P. 5325.

На автореферат поступило 4 положительных отзывов из следующих организаций: Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (к.б.н., в.н.с. лаборатории растительно-микробных взаимодействий Еникеев А.Г.); ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН (к.б.н., с.н.с. лаборатории лекарственных растений Маняхин А.Ю.); Федерального научного центра агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки (к.б.н., в.н.с. лаборатории селекционно-генетических исследований полевых культур Фисенко П.В.); Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН (к.х.н., н.с. лаборатории клеточных технологий Агеенко Н.В.).

Имеется замечание:

в отзыве к.б.н. Еникеева А.Г., СИФИБР СО РАН

«Некоторые сомнения вызывает предположение автора о возможности использования исследуемых технологий в практике сельскохозяйственного производства из-за относительной сложности получения и высокой себестоимости продукта».

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается компетентностью в соответствующей отрасли науки ученых, имеющих публикации в соответствующей сфере исследования, имеющие научные школы, способные определить научную и практическую ценность диссертации, давшие своё согласие (пп. 22,24 Положения... от 24.09.2013 г., №842).

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая методика, применимая к селективной регуляции экспрессии трансогенов и собственных генов растений *Arabidopsis thaliana* с помощью экзогенных последовательностей двухцепочечных РНК (дцРНК) и последовательностей коротких интерферирующих РНК (киРНК) для индукции РНК-интерференции в полученных растениях с последующим повышением уровня содержания вторичных метаболитов;

предложен новый комплексный подход для улучшения качеств растений без генетических модификаций генома растения;

доказана перспективность применения последовательностей экзогенных дцРНК и киРНК в растениеводстве;

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказано участие экзогенных последовательностей дцРНК и киРНК в селективной регуляции экспрессии трансгенов *NPTII* и *EGFP*, а также собственных генов растений, на примере *AtCHS*, *AtMYBL2* и *AtANAC032* у *A. thaliana*, участвующих в регуляции биосинтеза антоцианов, с последующим изменением уровня соответствующих вторичных метаболитов;

применительно к проблематике диссертации результативно использованы молекулярно-биологические методы создания генетических конструкций, подходы биоинженерии и биотехнологии растений, методы выделения и анализа нуклеиновых кислот, анализ экспрессии генов растений, биохимический анализ вторичных метаболитов;

изложены результаты исследований регуляции экспрессии генов *A. thaliana* с помощью экзогенного применения *in vitro* синтезированных последовательностей дцРНК и киРНК;

раскрыта роль экзогенных последовательностей дцРНК и киРНК в селективной регуляции экспрессии генов *A. thaliana* посредством механизма РНК-интерференции;

изучена взаимосвязь между концентрациями дцРНК и киРНК, временем суток, степени увлажненности почвы и возраста растений в момент обработки поверхности растений растворами дцРНК, а также предложены рекомендации для эффективного ингибирования экспрессии целевого гена;

проведена модернизация процесса экзогенного воздействия последовательностей дцРНК и киРНК на растения для селективной регуляции экспрессии генов без модификации их генома;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждены тем, что:

разработаны и опробированы технологии регуляции экспрессии генов растений без модификации генома растений;

определены перспективы использования дцРНК и киРНК для регуляции экспрессии генов растений в сельском хозяйстве;

создана модель эффективной избирательной регуляции экспрессии генов с помощью экзогенных последовательностей дцРНК и киРНК;

представлены методические рекомендации по использованию метода основанном на механизме РНК-интерференции с целью регуляции экспрессии генов;

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что для экспериментальных работ достоверность полученных результатов воспроизводилась в трех экспериментальных повторах. Опыты спланированы логично, были использованы современные и актуальные методы исследования на приборной базе общемирового уровня;

теоретические обоснования результатов, представленные соискателем, согласуются с принятой общемировой научной концепцией в данной области и в значительной мере развивают её;

идея, лежащая в основе разработки, базируется на анализе мировой литературы посвященной роли экзогенных некодирующих РНК в регуляции экспрессии генов растений и их патогенов;

использован анализ авторских данных и данных, полученных ранее по изучению роли экзогенных некодирующих РНК в регуляции экспрессии трансгенов и собственных генов растений с последующим влиянием на вторичный метаболизм растений;

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах процесса исследования. Соискатель принимал участие в получении трансгенных растений *A. thaliana*, их культивации, получении последовательностей дцРНК и киРНК, анализе экспрессии генов при помощи метода ПЦР с детекцией результатов в реальном времени, экстракции и анализе вторичных метаболитов, анализе влияния различных факторов на эффективность применения дцРНК и киРНК. Автор анализировал все полученные данные статистически, также лично участвовал в конференции с целью апробации полученных результатов работы, написании и публикации работ.

Диссертационный совет пришел к выводу, что диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, которая соответствует критериям, установленным Положением о порядке присуждения учёных степеней, п. 9, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842.

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. Какова концентрация действовавшего раствора хлорида натрия на опытные растения в эксперименте с устойчивостью *A. thaliana*?
2. Из каких соображений в качестве маркерного показателя действия был выбран уровень содержания антоцианов в растении *A. thaliana*?
3. Каков механизм проникновения опытных последовательностей дцРНК и киРНК в клетки растения *A. thaliana*?
4. Насколько эффективно действуют разработанные соискателем последовательности дцРНК и киРНК в сравнении с известными фитогормонами при анализе индукции биосинтеза антоцианов в растении *A. thaliana*?

Соискатель Супрун А.Р. ответил на все вопросы, привел собственную аргументацию в ответах на вопросы дискуссионного характера и согласился с критическими замечаниями.

На заседании 20 декабря 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Супруну А.Р. ученую степень кандидата биологических наук за решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 16 докторов наук по специальности биотехнология, 3 доктора наук по специальности биохимия участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, дополнительно введены на разовую защиту 3 человека, проголосовали: за -20, против - нет, недействительных бюллетеней - нет.

Председатель
диссертационного совета,
академик РАН

Ученый секретарь
диссертационного совета,

к.б.н.

21.12.2022 г.



Журавлев Юрий Николаевич

Тюнин Алексей Петрович